

PCT/JP03/04765

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

15.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2002年 4月15日

出 願 番 号  
Application Number:

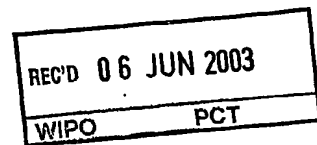
特願2002-112722

[ ST.10/C ]:

[ JP2002-112722 ]

出 願 人  
Applicant(s):

学校法人慶應義塾



**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3036773

BEST AVAILABLE COPY

特 2 0 0 2 - 1 1 2 7 2 2

【書類名】 特許願  
【整理番号】 000000301  
【提出日】 平成14年 4月15日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61K 48/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内  
    【氏名】 天谷 雅行  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内  
    【氏名】 西川 武二  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内  
    【氏名】 大山 学  
【特許出願人】  
    【識別番号】 899000079  
    【氏名又は名称】 学校法人 慶應義塾  
【代理人】  
    【識別番号】 100107984  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 廣田 雅紀  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100102255  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 小澤 誠次  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100118957  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 岡 晴子

特 2 0 0 2 - 1 1 2 7 2 2

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 免疫抑制剤と、遺伝性疾患の責任遺伝子とを備えたことを特徴とする遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。

【請求項 2】 免疫抑制剤と、遺伝性疾患の責任遺伝子とを含むことを特徴とする請求項 1 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。

【請求項 3】 免疫抑制剤が、T 細胞表面上の接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する受容体 CD 4 0 L と、抗原提示細胞表面上の受容体 CD 4 0 との間の相互作用を阻害するアンタゴニストを有効成分とすることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。

【請求項 4】 相互作用を阻害するアンタゴニストが、抗 CD 4 0 L 抗体であることを特徴とする請求項 3 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。

【請求項 5】 遺伝性疾患の責任遺伝子が、ウイルスベクターの形態又は裸 DNA (naked DNA) の形態であることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。

【請求項 6】 遺伝性疾患が、劣性遺伝性疾患であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。

【請求項 7】 劣性遺伝性疾患が、常染色体劣性遺伝性疾患であることを特徴とする請求項 6 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 7 のいずれか記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤を用いることを特徴とする遺伝性疾患の治療方法。

【請求項 9】 遺伝性疾患が、劣性遺伝性栄養障害型先天性表皮水疱症、接合部型先天性表皮水疱症、ヘミデスモゾーム型先天性表皮水疱症、又は先天性魚鱗癬であることを特徴とする請求項 8 記載の遺伝性疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、劣性遺伝性疾患等の遺伝性疾患の遺伝子治療における導入遺伝子産

物に対する免疫応答を抑制することができる遺伝子治療用薬剤や、かかる遺伝子治療用薬剤を用いての劣性遺伝性疾患等の遺伝性疾患の治療方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、様々な遺伝性疾患が多い皮膚科領域において、遺伝子診断が現実のものとなり、遺伝子診断による出生前診断が実際に施行されるようになり、基礎医学での成果が臨床に還元されるようになってきた。現在では次のステップとして、遺伝的な欠損を根本的に治す治療法の開発が待ち望まれている。遺伝子治療を現実のものとするためには、効率のよい遺伝子導入法、持続性のある遺伝子発現法の開発など遺伝子発現そのものに関しても様々な問題が存在するが、各種ウイルスベクターの開発などにより、徐々にではあるが解決法の糸口が見えつつある。

【0003】

しかし、現在まであまり取り上げられておらず、かつ、実際の臨床応用の際には必ず克服しなければならない課題として、外来から導入した遺伝子産物に対する免疫応答の問題がある。常染色体劣性の遺伝病の場合、責任遺伝子産物（特に、細胞外構成蛋白の場合）が患者の個体発生の段階から欠損しているため、免疫系が発生・分化する過程において、患者の免疫系はその蛋白に出会っていない。つまり、患者の個体においてはその蛋白に対する免疫寛容が成立していない。従って、遺伝子欠損による症状を是正するために、外来から正しい遺伝子を導入する遺伝子治療を施行した場合、個体が即座にその遺伝子産物を異物とみなして免疫応答が生じ、遺伝子治療の治療効果が失われる可能性がある。こうした導入遺伝子産物に対する免疫応答は、その抑制の必要性が近年徐々に認識されてきつつあるが、現時点では主としてウイルスベクターを用いた、皮膚以外の臓器に対する遺伝子治療において、ベクターに対する免疫応答とともに論じられている程度であり（例えば、特表平10-507758号公報、特表2001-512142号公報など）、未だに十分な検討はなされていない。また、その抑制方法としては、遺伝子産物に対する免疫寛容の確立、免疫抑制剤の使用、免疫応答の確立に必要な免疫応答細胞の表面分子の結合阻害などが試みられてきたが、確立されたものはないのが現状である。以下、発明に関する先行技術を列挙する。

【0004】

- 1) Amagai M, Hashimoto T, Shimizu N, and Nishikawa T: Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. *J Clin Invest* 94:59-67, 1994
- 2) Amagai M, Klaus-Kovtun V, and Stanley JR: Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67:869-877, 1991
- 3) Amagai M, Koch PJ, Nishikawa T, and Stanley JR: Pemphigus vulgaris antigen (Desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol* 106:351-355, 1996
- 4) Amagai M, Tsunoda K, Suzuki H, Nishifuji K, Koyasu S, and Nishikawa T: Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest* 105:625-631, 2000
- 5) Chen M, O'Toole EA, Muellenhoff M, Medina E, Kasahara N, and Woodley DT: Development and characterization of a recombinant truncated type VI collagen "minigene". Implication for gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Biol Chem* 275:24429-24435, 2000
- 6) Choate KA, Medalie DA, Morgan JR, and Khavari PA: Corrective gene transfer in the human skin disorder lamellar ichthyosis. *Nat Med* 2:1263-1267, 1996
- 7) Christensen R, Jensen UB, and Jensen TG: Cutaneous gene therapy-an update. *Histochem Cell Biol* 115:73-82, 2001
- 8) Dai Y, Schwarz EM, Gu D, Zhang W-W, Sarvetnick N, and Verma IM: Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: Tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc Natl Acad Sci* 92:1401-1405, 1995
- 9) Datta SK, and Kalled SL: CD40-CD40 ligand interaction in autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 40:1735-1745, 1997
- 10) Dellambra E, Vailly J, Pellegrini G, Bondanza S, Golisano O, Macch

- ia C, Zambruno G, Meneguzzi G, and De Luca M: Corrective transduction of human epidermal stem cells in laminin-5-dependent junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther* 9:1359-1370, 1998
- 1 1) Freiberg RA, Choate KA, Deng H, Alperin ES, Shapiro LJ, and Khavari PA: A model of corrective gene transfer in X-linked ichthyosis. *Hum Mol Genet* 6:927-933, 1997
- 1 2) Greenhalgh DA, Rothnagel JA, and Roop DR: Epidermis: An attractive target tissue for gene therapy. *J Invest Dermatol* 103:63S-69S, 1994
- 1 3) Hengge U, Chan EF, Foster RA, Walker PS, and Vogel JC: Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. *Nat Genet* 10:161-166, 1995
- 1 4) Hengge UR, Walker PS, and Vogel JC: Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J Clin Invest* in press, 1996
- 1 5) Ilan Y, Prakash R, Davidson A, Jona V, Droguette G, Horwitz MS, Chowdhury NR, and Chowdhury JR: Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors. *J Clin Invest* 99:1098-1106, 1997
- 1 6) Jensen TG, Jensen UB, Jensen PK, Ibsen HH, Brandrup F, Ballabio A, and Bolund L: Correction of steroid sulphatase deficiency by gene transfer into basal cells of tissue-cultured epidermis from patients with recessive X-linked ichthyosis. *Exp Cell Res* 209:392-397, 1993
- 1 7) Katsumi A, Emi N, Abe A, Hasegawa Y, Ito M, and Saito H: Humoral and cellular immunity to an encoded protein induced by direct DNA injection. *Hum Gene Ther* 5:, 1994
- 1 8) Kay MA, Hotlterman AX, Meuse L, Allen G, Ochs HD, Linsley PS, and Wilson CB: Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression in mice following CTLA4Ig administration. *Nat Genet* 11:191-197, 1995
- 1 9) Khavari PA: Gene therapy for genetic skin disease. *J Invest Dermatol* 110:462-467, 1998

- 20) Khavari PA: Genetic correction of inherited epidermal disorders. *Hum Gene Ther* 11:2277-2282, 2000
- 21) Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, Pulkkinen L, Uitto J, Shultz L, Murphy GF, Whitaker-Menezes D, and Stanley JR: Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 137:1091-1102, 1997
- 22) Larregina AT, and Falo LD: Generating and regulating immune responses through cutaneous gene delivery. *Hum Gene Ther* 11:2301-2305, 2000
- 23) Morral N, O'neal W, Zhou H, Langston C, and Beaudet A: Immune response to reporter proteins and high viral dose limit duration of expression with adenoviral vectors: comparison of E2a wild type and E2a deleted vectors. *Hum Gene Ther* 8:1275-1286, 1997
- 24) Ohyama M, Amagai M, Tsunoda K, Ota T, Koyasu S, Hata J, Umezawa A, and Nishikawa T: Immunologic and histopathologic characterization of active disease mouse model for pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol* 118:199-204, 2002
- 25) Seitz CS, Giudice GI, Balding SD, Marinkovich MP, and Khavari PA: BP180 gene delivery in junctional epidermolysis bullosa. *Gene Ther* 6:42-47, 1999
- Spirito F, Meneguzzi G, Danos O, and Mezzina M: Cutaneous gene transfer and therapy; the present and the future. *J Gene Med* 3:21-31, 2001
- 26) Stein CS, Martins I, and Davidson BL: Long-term reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor (LDLR)-deficient mice by adenovirus-mediated LDLR gene transfer combined with CD154 blockade. *J Gene Med* 2:41-51, 2000
- 27) Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, and Leiden JM: Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med* 2:54

5-550, 1996

28) Uitto J, and Pulkkinen L: The genodermatoses: candidate disease for gene therapy. Hum Gene Ther 11:2267-2275, 2000

29) Vailly J, Gagnoux-Palacios L, Del'Ambra E, Romero C, Pinola M, Zambun G, De Luca M, Ortonne J-P, and Meneguzzi G: Corrective gene transfer of keratinocytes from patients with junctional epidermolysis bullosa restores assembly of hemidesmosomes in reconstructed epithelia. Gene Ther 13:1322-1322, 1998

30) Vogel JC: Keratinocyte gene therapy. Arch Dermatol 129:1478-1483, 1993

31) Vogel JC: Nonviral skin gene therapy. Hum Gene Ther 11:2253-2259, 2000

32) Yamada A, and Sayegh MH: The CD154-CD40 costimulatory pathway in transplantation. Transplantation 73:S36-S39, 2002

33) Yang Y, Su Q, Grewal IS, Schilz R, Flavell RA, and Wilson JM: Transient subversion of CD40 ligand function diminishes immune response to adenovirus vectors in mouse liver and lung tissues. 1996 70:6370-6377, 1996

34) Yao SN, Farjo A, Roessler BJ, Davidson BL, and Kurachi K: Adenovirus-mediated transfer of human factor IX gene in immunodeficient and normal mice. Viral Immunol 9:141-153, 1996

35) Zeng L, Sarasin A, and Mezzina M: Retrovirus-mediated DNA repair gene transfer into xeroderma pigmentosum cells. Cell Biol Toxicol 14:105-110, 1998

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

欠損遺伝子が知られている先天性の遺伝性疾患の治療には、欠損遺伝子を補充する遺伝子治療を施すことが必要とされるが、遺伝子欠損患者には欠損している遺伝子産物に対して免疫寛容が成立していないため、正しい遺伝子を導入した際

に入れた遺伝子産物に対する免疫応答を惹起し、自己免疫を誘導してしまい、最終的に入れた遺伝子を正しく機能させることができない。本発明の課題は、劣性遺伝性疾患等の遺伝性疾患の遺伝子治療における導入遺伝子産物に対する免疫応答を抑制することができる遺伝子治療用薬剤や、かかる遺伝子治療用薬剤を用いての劣性遺伝性疾患等の遺伝性疾患の治療方法を提供することにある。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】

従来からの遺伝子治療における導入遺伝子産物に対する免疫応答の評価、そしてその抑制の試みにおいては、1) 不適切な免疫応答が生じる可能性は、発生の段階において導入遺伝子産物を完全に欠く、つまり常染色体劣性遺伝の表現型を有する個体に欠損遺伝子を導入した際に極めて高くなるにも関わらず、こうした遺伝子欠損個体を対象としておらず、単に被験対象個体に遺伝子導入を行い、産物に対する免疫応答の抑制法を評価している、2) 遺伝子導入法としては、主としてアデノウイルスなどのウイルスベクターを用いた方法がとられており、ウイルスベクターに対する治療対象個体の免疫応答と関連のない、純粋に導入遺伝子産物のみに対する免疫応答、応答の抑制が評価されていない、3) ウイルスを用いない遺伝子導入法を用いた系では、抑制法の適応対象となる、導入遺伝子産物に対する免疫応答を評価できる程の安定した遺伝子発現が得られない、4) 効率がよく、副作用の少ない免疫応答抑制法の評価が不十分である、などの問題点があった。

【 0 0 0 7 】

こうした従来技術の問題点に鑑み、本発明者らは、1) 遺伝子治療の対象とする疾患モデル動物の選定にあたっては、機能が十分に解明されている単一遺伝子の欠損を有し、かつ、その病態生理が十分に解明されているものとする、2) ウイルスを用いない遺伝子導入法を用いて純粋に導入遺伝子産物に対する免疫応答と、その抑制法のみ評価する、3) 安定した遺伝子発現が得られない場合には、遺伝子導入が成功した状態を模擬する適切な系を確立する、4) 薬剤などによらず、免疫応答の惹起に必須の生体内での経路を生物学的に遮断する生理活性物質を使用することで効率のよい免疫応答の抑制を実現する、ことをコンセプトとし

、皮膚の構成成分が欠損しているノックアウトマウスに、正しい遺伝子を導入する遺伝子治療を施行し、その遺伝子産物に対する免疫応答の有無を確認し、遺伝子治療における免疫応答を解析できる実験動物モデルの系を作製した後、外来遺伝子産物に対する免疫応答を抑制するために、免疫寛容を成立させるなどの各種方法を検討した。

【0008】

具体的には、表皮構成成分で細胞膜蛋白であるデスモグレイン3 (Dsg3) を欠損させたDsg3ノックアウト (Dsg3<sup>-/-</sup>) マウスを用いた。このマウスは、細胞間接着分子であるDsg3が欠損しているために、口腔内における水疱・びらん形成、ならびに休止期 (telogen) にある被毛の脱毛を生じる。このマウスに対する遺伝子治療として、発現ベクターに組み込んだ正しい遺伝子配列を持ったマウスDsg3遺伝子を、Naked DNA injection法を用いて表皮細胞に導入したところ、導入Dsg3遺伝子が表皮ならびに毛嚢において発現することが確認できた。また、発現したDsg3に対する抗体産生が持続することが確認されたが、遺伝子治療に先立ち、免疫抑制剤として抗CD40Lモノクローナル抗体を導入することにより、遺伝子治療の治療効果を損なう可能性のある導入遺伝子産物Dsg3に対する免疫応答が効果的に抑制されることも確認することができた。本発明はこれら知見に基づいて完成するに至ったものである。

【0009】

すなわち本発明は、免疫抑制剤と、遺伝性疾患の責任遺伝子とを備えたことを特徴とする遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤 (請求項1) や、免疫抑制剤と、遺伝性疾患の責任遺伝子とを含むことを特徴とする請求項1記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤 (請求項2) や、免疫抑制剤が、T細胞表面上の接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する受容体CD40Lと、抗原提示細胞表面上の受容体CD40との間の相互作用を阻害するアンタゴニストを有効成分とすることとを特徴とする請求項1又は2記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤 (請求項3) や、相互作用を阻害するアンタゴニストが、抗CD40L抗体であることを特徴とする請求項3記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤 (請求項4) や、遺伝性疾

患の責任遺伝子が、ウイルスベクターの形態又は裸DNA (naked DNA) の形態であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤 (請求項 5) や、遺伝性疾患が、劣性遺伝性疾患であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤 (請求項 6) や、劣性遺伝性疾患が、常染色体劣性遺伝性疾患であることを特徴とする請求項 6 記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤 (請求項 7) に関する。

【0010】

また本発明は、請求項 1～7 のいずれか記載の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤を用いることを特徴とする遺伝性疾患の治療方法 (請求項 8) や、遺伝性疾患が、劣性遺伝性栄養障害型先天性表皮水疱症、接合部型先天性表皮水疱症、ヘミデスモゾーム型先天性表皮水疱症、又は先天性魚鱗癬であることを特徴とする請求項 8 記載の遺伝性疾患の治療方法 (請求項 9) に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明は、免疫抑制剤と、遺伝性疾患の責任遺伝子とを備えたことを特徴とする遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤であれば特に制限されるものではなく、ここで遺伝性疾患とは、欠損遺伝子を補充する遺伝子治療を施した場合、欠損している遺伝子産物に対して免疫寛容が成立していない遺伝性の疾患をいい、常染色体劣性遺伝性疾患や伴性劣性遺伝性疾患等の劣性遺伝性疾患を挙げることができ、上記常染色体劣性遺伝性疾患としては、劣性遺伝性栄養障害型先天性表皮水疱症、接合部型先天性表皮水疱症、ヘミデスモゾーム型先天性表皮水疱症、先天性魚鱗癬、白児症 (白皮症)、ティ・サックス病、ウィルソン病、嚢胞性線維症、フェニルケトン尿症、糖原病 I 型、ガラクトース血症等を具体的に例示することができ、伴性劣性遺伝性疾患としては、色盲、血友病 A、Duchenne 型筋ジストロフィー等を具体的に例示することができる。

【0012】

上記免疫抑制剤としては、遺伝子治療を施した場合に欠損していた遺伝子産物により惹起される免疫応答を抑制しうるものであれば、公知の免疫抑制剤をも含め、特に制限されるものではなく、シクロスポリン A、タクロリムス (FK506)、

シクロホスファミド、アザチオプリン、ミゾリビン、ステロイド、メソトレキセート等の他、T細胞表面上の接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する受容体CD40Lと、抗原提示細胞表面上の受容体CD40との間の相互作用を阻害するアンタゴニストを好適に例示することができ、かかるアンタゴニストとしては、CD40Lに対して向けられた抗体（例えばCD40Lに対するモノクローナル抗体）、CD40Lに対して向けられた抗体のフラグメント（例えばFab又は(Fab')<sub>2</sub>フラグメント）、キメラ抗体、ヒト化抗体、可溶性CD40若しくは可溶性CD40L及びそれらのフラグメント、又はその他のCD40LとCD40との相互作用を阻害する化合物を挙げることができる。

【0013】

上記遺伝性疾患の責任遺伝子は、通常、ウイルスベクターの形態、裸DNA (naked DNA) の形態、リボソーム包摂形態等で用いられ、責任遺伝子は、ゲノムDNA、cDNA、mDNA又は合成DNAであってもよい。上記ウイルスベクターは、DNA又はRNAウイルスをもとに作製できるが、由来するウイルス種は特に限定はされず、MoMLVベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、HIVベクター、センダイウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター等のいかなるウイルスベクターであってもよい。

【0014】

例えば、アデノウイルスベクターとしては、ITR（逆位末端反復配列）と包膜配列とを含んでおり、E1アデノウイルス領域の総て又は一部を欠いているものが好ましく、さらに、E3アデノウイルス領域の総て又は一部を欠いていてもよいが、糖タンパク質gp19kをコードするE3領域の一部を保持していることが好ましい。また、HIVベクターは導入した核酸を染色体に組み込むため、該核酸である薬物遺伝子を長期間に渡って発現することができ、また、HIVベクターは、細胞表面分子であるCD4陽性T細胞への選択的な遺伝子導入が可能である上に、細胞が分裂していない静止期でも染色体に組み込むことが可能であるため、例えば、HIVの外皮タンパク質であるEnvタンパク質を、小水痘性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus) の外皮タンパク質であるVSV

—Gタンパク質に置換したシュードタイプ型のHIVウイルスベクターを用いれば、骨髄幹細胞、造血幹細胞、神経細胞、筋肉細胞などの静止期にある、いかなる細胞へも効率的に薬物遺伝子を導入することが可能となる。

【0015】

裸DNA (naked DNA) 形態として、プラスミドDNAの形態を好適に例示することができ、かかるプラスミドとしては公知の動物細胞用発現ベクタープラスミドを挙げることができる。かかるベクタープラスミドは、ウイルスプロモーター、例えば、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーター、HSV-1 ウイルスTK遺伝子のプロモーター、SV40 (シミアンウイルス40) 初期プロモーター、アデノウイルスMLP (主要後期プロモーター) プロモーターを含むものが好ましい。その他、トランスフェクトされた細胞を選択又は同定することができるマーカー遺伝子を含んでいてもよく、かかるマーカー遺伝子としては、抗生物質G418に対する耐性を付与するneo遺伝子 (ネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードしている)、dhfr (ジヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子、CAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) 遺伝子、pac (ピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ) 遺伝子、gpt (キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ) 遺伝子を挙げることができる。

【0016】

上記のように、本発明の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤は、免疫抑制剤と遺伝性疾患の責任遺伝子とを備えたものであるが、免疫抑制剤が例えばCD40Lのようにタンパク質又はペプチドからなる場合、かかるタンパク質又はペプチドをコードするDNAと責任遺伝子とを、ウイルスベクターやプラスミドベクターにコインテグレートして、免疫抑制剤と遺伝性疾患の責任遺伝子とを含む遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤とすることもできる。本発明の遺伝子治療用薬剤は、遺伝性疾患の患者に投与することができる他、遺伝性疾患の発症が予想される患者に対しても投与することができる。

【0017】

本発明の遺伝性疾患の治療方法は、上記本発明の遺伝性疾患の遺伝子治療用薬

剤を1回又は2回以上用いることにより行われ、免疫抑制剤と遺伝性疾患の責任遺伝子とを同時に、あるいは遺伝性疾患の責任遺伝子で遺伝子治療を施す前後に免疫抑制剤を投与することができるが、投与部位を異にしてもよい。投与は、注射等の非経口投与又は経口投与により、皮下、静脈内、筋肉内、腹膜内、滑液内、肺内、胃内、鼻腔内、気管内等に行うことができる。本発明の遺伝子治療用薬剤の剤形は、投与方法により適宜選択され、例えば、注射用途に適した医薬組成物としては、滅菌水溶液（水溶性の場合）又は分散液及び滅菌注射溶液又は分散液を即座に調製するための滅菌粉末を挙げることができる。また、投与量は、治療効果を期待できる十分な量であり、患者の年齢、性差、薬剤に関する感受性、投与方法、疾患の履歴などにより適宜選択しうる。

【0018】

#### 【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例1 [Naked DNA injection法によるDsg3<sup>-/-</sup>マウス表皮へのDsg3遺伝子の導入]

Dsg3は表皮細胞間の接着機構、デスモゾームの構成成分である細胞表面蛋白である。CMVのプロモーターを用いた発現ベクターであるpcDNA (Invitrogen corporation, Carlsbad, CA) にマウスDsg3 (mDsg3) をサブクローニングし作製したプラスミド (pcDNA:mDsg3) をPBSで1~10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の濃度に希釈した溶液を、既報のNaked DNA injectionの方法に従いDsg3<sup>-/-</sup>マウスの真皮浅層に注入した。注入18時間後に、プラスミド導入部位を生検して得られた組織切片を、抗mDsg3モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体直説法で観察したところ、pcDNA:mDsg3を導入した部位の表皮細胞間にmDsg3の発現が確認された (図1a)。コントロールとしてpcDNAを導入した部位ではこのような所見は見られなかった (図1b)。以上のことより、Naked DNA injection法によりDsg3が通常のマウス個体内における発現部位に導入されうることが明らかとなった。

【0019】

実施例2 [Ds g 3 遺伝子導入による抗Ds g 3 I g G抗体産生の検討]

Naked DNA injection法により、表皮にDs g 3 遺伝子を導入したDs g 3<sup>-/-</sup>マウスにおいて、導入遺伝子産物に対する抗体が産生されるか否かを、バキュロウイルス発現系を用いて得られた組換えmDs g 3を用いたenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により検討した。遺伝子治療のプロトコールとして、1) 50  $\mu$ g/個体のp cDNA : mDs g 3を週1回投与、2) 50  $\mu$ g/個体のp cDNA : mDs g 3を週2回投与、3) 100  $\mu$ g/個体のp cDNA : mDs g 3を週1回投与、4) 100  $\mu$ g/個体のp cDNA : mDs g 3を週2回投与、5) 200  $\mu$ g/個体のp cDNA : mDs g 3を1回のみ投与、6) 200  $\mu$ g/個体のp cDNA : mDs g 3を2週に1回投与、のような投与方法を設定し、各プロトコールにつき2個体のDs g 3<sup>-/-</sup>マウスを使用した。このうち、2) から4) までの投与方法で遺伝子を導入したDs g 3<sup>-/-</sup>マウス各1個体、6) の方法で投与した2個体の血清中にELISA法にて抗Ds g 3 I g G抗体の産生が確認された。特に6) の方法で遺伝子を導入した2個体では60日という長期にわたり抗体産生が持続することが確認された(図2)。

【0020】

実施例3 [遺伝子治療により産生された抗Ds g 3 I g G抗体の導入遺伝子産物への結合性の検討]

Ds g 3 遺伝子導入で産生された抗Ds g 3抗体が、実際に個体内で遺伝子導入により発現させたDs g 3を認識するか否かを確認した。ELISA法で抗体価の上昇が確認されたDs g 3<sup>-/-</sup>マウスの表皮に前述の手法をもちいて遺伝子導入をした後、治療部位を生検した。得られた組織切片を、抗マウスI g Gポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体直接法を用いて観察したところ、遺伝子導入部位に一致して表皮細胞間にI g Gの沈着が確認された(図3)。以上より、遺伝子治療の副産物として産生された導入遺伝子産物に対する抗体が、実際に導入遺伝子産物に結合する可能性が示された。

【0021】

実施例 4 [安定した遺伝子導入を模擬する実験系； $Dsg3^{+/+}$ マウス皮膚を $Dsg3^{-/-}$ マウスに移植する系の確立]

以上までの検討により、 $Dsg3^{-/-}$ マウスに $Dsg3$ 遺伝子を導入することにより導入遺伝子産物に対して抗体産生が生じ、かつ生じた抗体は導入遺伝子産物を認識しうることが示された。しかし、この検討で用いたNaked DNA injection 法は、ヒト、ブタなどの表皮に厚みを持つ動物では比較的安定した遺伝子導入が期待できるが、マウスでは表皮がきわめて薄いため安定した遺伝子導入が期待できない。そこで、さらに遺伝子治療における免疫応答の検討を進めるため、 $Dsg3^{+/+}$ マウスの皮膚を $Dsg3^{-/-}$ マウスに移植する系を確立した。植皮片が生着した個体（図4）では、局所的に表皮への $Dsg3$ 導入が成功した状態が模擬されていると考えられる。また、この系（以下 $Dsg3^{+/+}$ グラフト系と略す）では植皮後約2週間で、Naked DNA injection法による遺伝子導入を行った場合と同様に、抗 $Dsg3$  IgG抗体の産生が生じることが前述のELISA法を用いた検討で確認された。そこで、以後の検討においては、安定した $Dsg3^{+/+}$ グラフト系を用いて遺伝子治療における免疫応答と、その抑制法を評価することとした。

【0022】

実施例 5 [抗CD40Lモノクローナル抗体を用いた $Dsg3^{+/+}$ グラフト系における抗 $Dsg3$  IgG抗体産生の抑制の検討]

抗原特異的な免疫応答の抑制法としては、すでに様々な方法が報告されている。当初、本発明者らは経口寛容により免疫反応を抑制することを計画し、大腸菌発現ベクターを用いて $Dsg3$ 蛋白を作製しマウスに経口投与したが、良好な結果を得ることはできなかった。そこで、免疫応答の確立に重要な役割を担っているCD40とCD40Lの結合を阻害することにより、 $Dsg3^{+/+}$ グラフト系における抗 $Dsg3$ 抗体産生の抑制を試みた。CD40Lは抗原刺激を受けた活性化T細胞に一過性に発現されるII型細胞膜貫通蛋白であり、その受容体であるCD40はB細胞、樹状細胞、単球／マクロファージ、内皮細胞などに発現されている。CD40-CD40L間結合はサイトカイン産生などを促すことで細胞性免疫において重要な役割を担うのみならず、B細胞の増殖、抗体産生などにお

いてもきわめて重要であることが明らかとなっており、この結合を阻害する抗CD40Lモノクローナル抗体を用いて、自己免疫性疾患、臓器移植などにおける免疫応答を抑制するところみがなされている。前述のごとくDsg3<sup>+/+</sup>グラフト系においては、植皮後約2週間で、ELISA法を用いて血清中に検出される抗Dsg3 IgG抗体産生がすべての植皮をうけた個体で生じる。しかし、ハムスター由来抗マウスCD40L抗体であるMR1を、植皮後0日(1000 $\mu$ g/個体)、2日、4日、7日、14日、21日、28日(500 $\mu$ g/個体)のスケジュールで腹腔内投与すると、この抗体産生は、有意に抑制されることがELISA法を用いて示された(図5)。

## 【0023】

実施例6 [Dsg3<sup>+/+</sup>グラフト系で産生される抗Dsg3 IgG抗体のインビボでのDsg3分子への結合の評価]

Dsg3<sup>+/+</sup>グラフト系において産生される抗Dsg3抗体が、実際にインビボでDsg3分子に結合することを示すために、植皮後4~5週の時点で植皮片を生検し、表皮細胞間へのIgGの沈着を抗マウスIgGポリクローナル抗体をもちいた蛍光抗体直接法にて評価した。MR1を投与したDsg3<sup>-/-</sup>マウス群では植皮片は生着し続けるが(図6a左)、コントロールとしてハムスターIgGを投与した群では植皮片は約3週で脱落する。そこで、この群においては植皮片が脱落した時点で、再植皮を行い、再植皮後5~7日目に再植皮片の生着を確認した(図6a右)後に生検を行った。コントロール群では、表皮細胞間にIgGの明らかな沈着が確認されたが(図6b)、MR1投与群ではこのような沈着は明らかではなかった(図6c)。以上より、Dsg3<sup>+/+</sup>グラフト系においてMR1が抗Dsg3 IgG抗体の産生を抑制することがインビボ、インビトロの両方のレベルで示された。

## 【0024】

## 【発明の効果】

本発明により、治療に先立ち抗CD40Lモノクローナル抗体を導入することにより、劣性遺伝性疾患モデルマウスにおいて成功した遺伝子治療の治療効果を損なう可能性のある導入遺伝子産物に対する免疫応答が効果的に抑制されること

が明らかになった。すなわち本発明によると、劣性遺伝性疾患に対する遺伝子治療を成功させるためには、導入遺伝子産物に対する免疫産物に対する免疫応の抑制が必要であり、かつ抗CD40Lモノクローナル抗体がその抑制に有用であることが示された。

【図面の簡単な説明】

【図1】

Naked DNA injection法によるDsg3<sup>-/-</sup>マウス表皮へのp cDNA:mDsg3の導入によるDsg3の発現を示す、蛍光抗体直接法の結果を示す図である。

a: p cDNA:mDsg3を導入した部位 (矢印)

b: p cDNAを導入した部位 (スケール: 50  $\mu$ m)

【図2】

導入遺伝子産物Dsg3に対するIgG抗体の産生を示す、ELISA法の結果を示す図である。

(縦軸: ELISA法のOD値、横軸: 治療開始後の日数)

【図3】

遺伝子治療により産生した抗Dsg3 IgG抗体の、遺伝子治療により発現させたDsg3への結合 (矢印) を示す、蛍光抗体直接法の結果を示す図である (スケール: 50  $\mu$ m)。

【図4】

Dsg3<sup>+/+</sup>マウスの植皮片 (矢印) が生着したDsg3<sup>-/-</sup>マウスを示す図である。

【図5】

Dsg3<sup>+/+</sup>をグラウト系における抗Dsg3 IgG抗体の産生を示す、ELISA法の結果を示す図である。コントロールとしてハムスターIgGの投与を受けた群では約2週間で抗Dsg3 IgG抗体の産生が生じる (実線) が、MR1の投与をうけた群 (点線) ではこのIgG産生が有意に抑制されている。

(縦軸: マウスDsg3 IgG ELISA法のOD値、横軸: 植皮からの日数)

【図6】

Dsg3<sup>+/+</sup>グラフト系で産生される抗Dsg3 IgG抗体のインビボでのDsg3分子への結合を示す、蛍光抗体直接法の結果を示す図である。

a: MR1を投与したDsg3<sup>-/-</sup>マウス群での植皮片の生着(図6a左)と、再植皮後5~7日目における再植皮片の生着(図6a右)(スケール: 1 cm)。

b: ハムスターIgG投与群では植皮片に表皮細胞間へのIgGの沈着が認められる(スケール: 50 μm)。

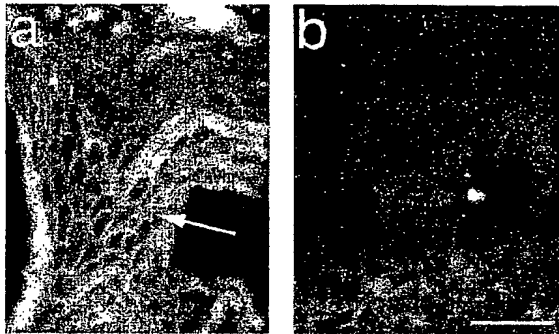
c: MR1投与群では植皮片に表皮細胞間へのIgGの沈着が認められない(スケール: 50 μm)。

特 2002-112722

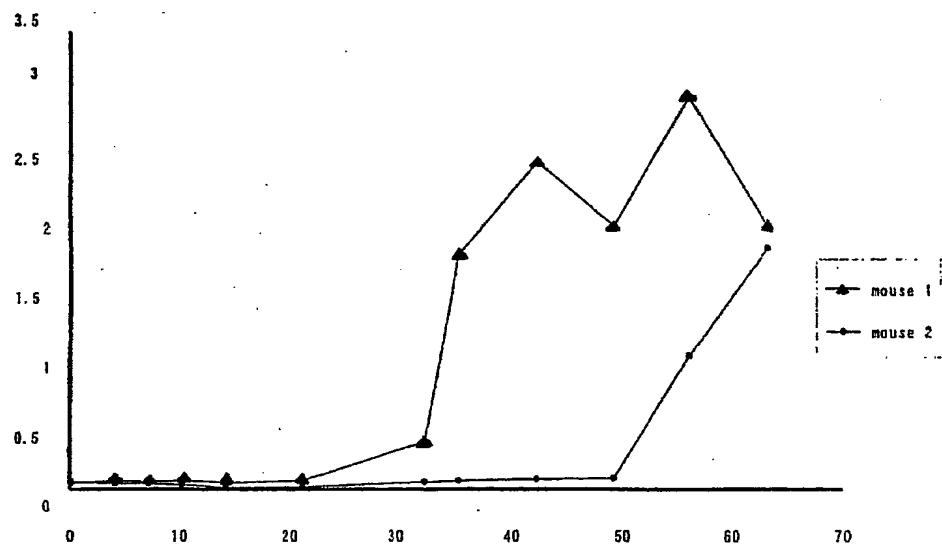
【書類名】

図面

【図 1】

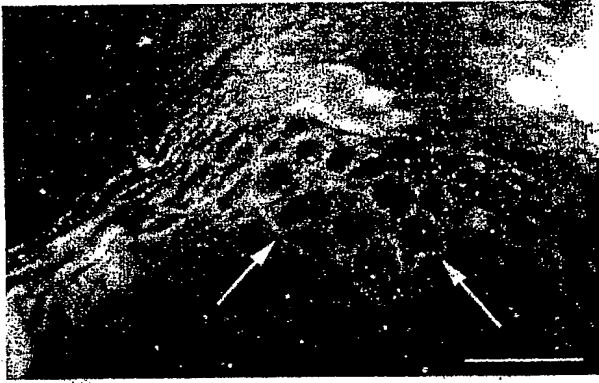


【図 2】

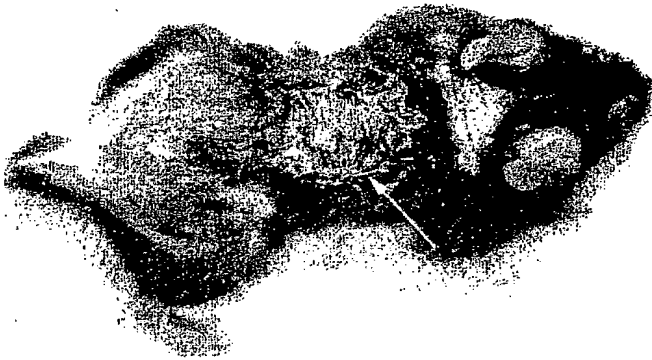


特2002-112722

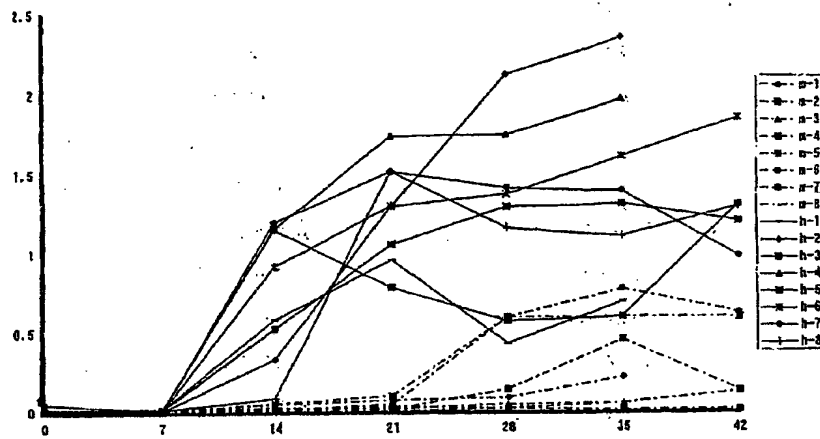
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 劣性遺伝性疾患等の遺伝性疾患の遺伝子治療における導入遺伝子産物に対する免疫応答を抑制することができる遺伝子治療用薬剤や、かかる遺伝子治療用薬剤を用いての劣性遺伝性疾患等の遺伝性疾患の治療方法を提供すること。

【解決手段】 免疫抑制剤と、劣性遺伝性栄養障害型先天性表皮水疱症、接合部型先天性表皮水疱症、ヘミデスモゾーム型先天性表皮水疱症、先天性魚鱗癬等の劣性遺伝性疾患の責任遺伝子とを含む遺伝性疾患の遺伝子治療用薬剤を調製する。上記免疫抑制剤としては、シクロスポリンや抗CD40L抗体を挙げることができる。また、上記遺伝性疾患の責任遺伝子は、ウイルスベクターの形態や裸DNA (naked DNA) の形態等で用いることができる。

特 2002-112722

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-112722
受付番号	50200548368
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成14年 4月17日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	899000079
【住所又は居所】	東京都港区三田2丁目15番45号
【氏名又は名称】	学校法人 慶應義塾

【代理人】

申請人

【識別番号】	100107984
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階 廣田特許事務所

【氏名又は名称】	廣田 雅紀
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100102255
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階 廣田特許事務所

【氏名又は名称】	小澤 誠次
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100118957
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階 廣田特許事務所

【氏名又は名称】	岡 晴子
----------	------

次頁無

特2002-112722

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [899000079]

1. 変更年月日	1999年 9月17日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都港区三田2丁目15番45号
氏 名	学校法人慶應義塾

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**